

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 02 November 2000 (02.11.00)	
International application No. PCT/EP00/02904	Applicant's or agent's file reference 21520P WO
International filing date (day/month/year) 31 March 2000 (31.03.00)	Priority date (day/month/year) 31 March 1999 (31.03.99)
Applicant HAMPP, Norbert et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
25 September 2000 (25.09.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

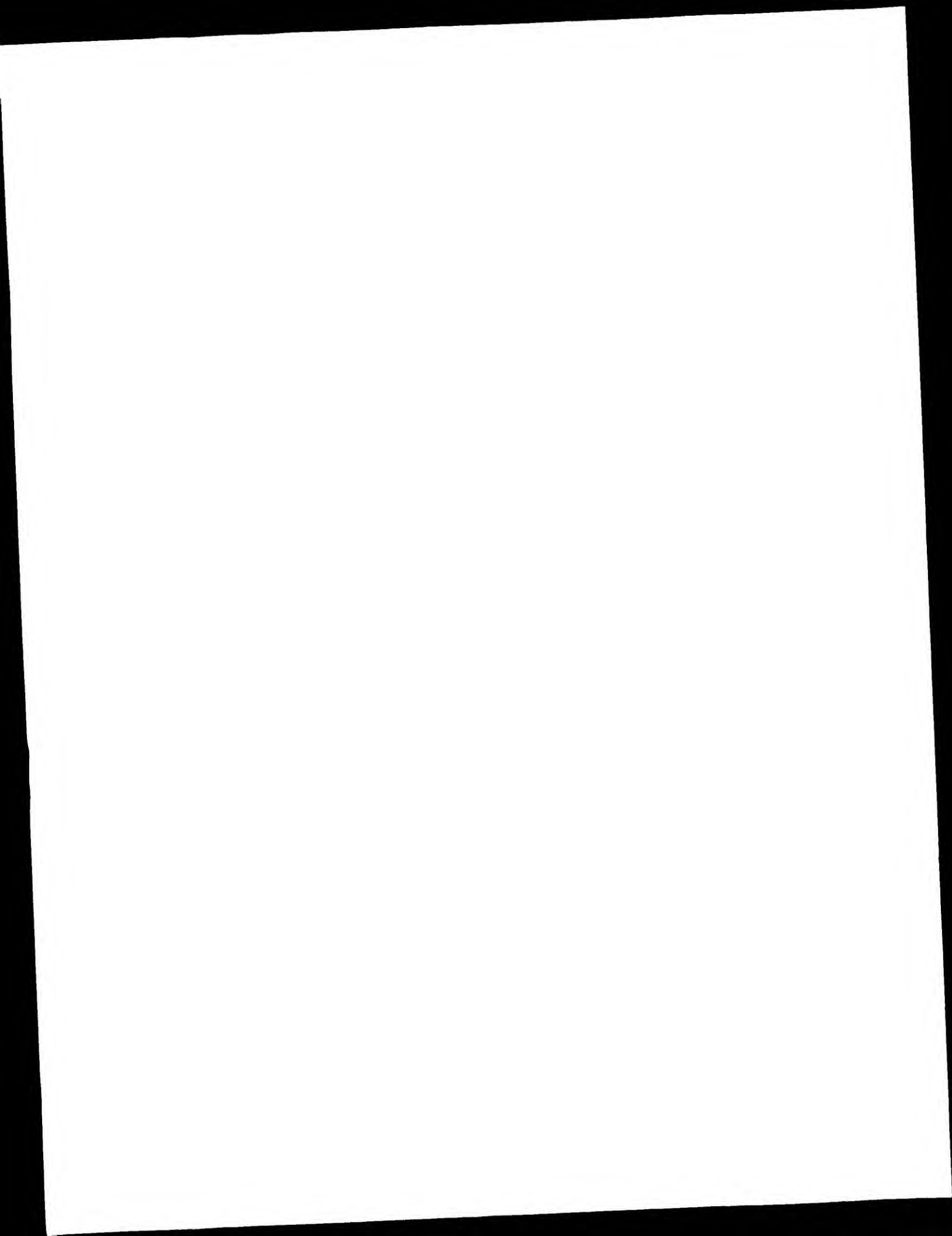
2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Manu Berrod
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

Form PCT/IB/331 (July 1992)

EP0002904

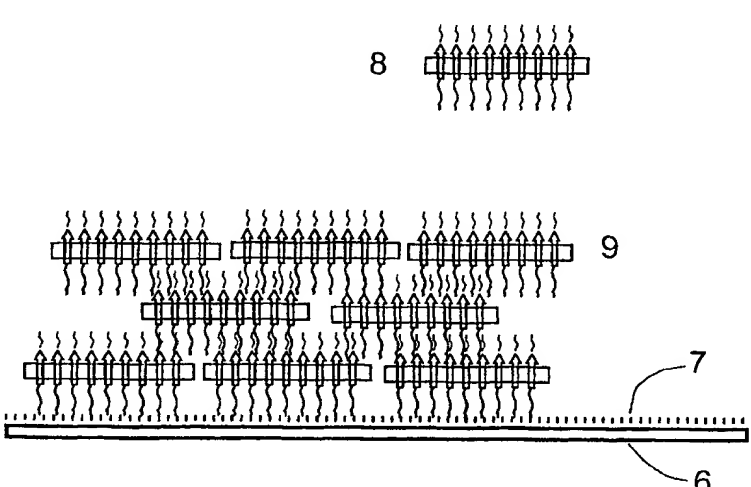


PCT

ORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12N 11/02, C07K 14/215, 17/02</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/58450 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 5. Oktober 2000 (05.10.00)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/02904 (22) Internationales Anmeldedatum: 31. März 2000 (31.03.00) (30) Prioritätsdaten: 199 14 702.7 31. März 1999 (31.03.99) DE 199 53 607.4 8. November 1999 (08.11.99) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: HAMPP, Norbert [DE/DE]; Schillerstrasse 10, D-35287 Amöneburg-Rossdorf (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SEITZ, Arne [DE/DE]; Weidenhäuserstr. 102, D-35037 Marburg (DE). PASTER- NACK, Ralf [DE/DE]; Konrad-Adenauerstr. 21, D-64347 Griesheim (DE). FUCHSBAUER, H.-L. [DE/DE]; Fürthweg 1a, D-64367 Mühlthal/Traisa (DE). (74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</p>
<p>(54) Title: LINKER-FREE COVALENT COUPLING OF BACTERIORHODOPSIN IN PURPLE MEMBRANE FORM</p>		
<p>(54) Bezeichnung: LINKERFREIE KOVALENTE KOPPLUNG VON BAKTERIORHODOPSIN IN PURPURMEMBRAN-FORM</p>		
		
<p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to a method for the linker-free covalent coupling of bacteriorhodopsin in purple membrane form.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Es wird ein Verfahren zur linkerfreien kovalenten Kopplung von Bakteriorhodopsin in Purpurnembran-Form beschrieben.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshjan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Linkerfreie kovalente Kopplung von Bakteriorhodopsin in Purpurmembran-Form

5

Beschreibung

Die Erfindung betrifft die linkerfreie kovalente Kopplung von Bakteriorhodopsin (BR) in membrangebundener Form, insbesondere in Purpurmembran-Form.

10

Bakteriorhodopsin (BR) ist ein Membranprotein, das z.B. in Halobakterien in der Form eines zweidimensionalen, scheibenförmigen, wasserunlöslichen Kristalls, der sogenannten Purpurmembran (PM) vorkommt. Die Purpurmembran hat eine Dicke von ca. 5 nm. Der Durchmesser der Purpurmembran liegt typischerweise im Bereich von 300 nm bis 1000 nm.

Die Purpurmembran besteht aus α -helikalen Bakteriorhodopsinmolekülen und ca. 10 Lipidmolekülen pro Bakteriorhodopsinmolekül. Das Bakteriorhodopsin ist in die aus den Lipidmolekülen gebildete Lipidmembran fast vollständig eingebettet. Daraus ergibt sich seine ungewöhnliche thermodynamische Stabilität.

Bakteriorhodopsin in Purpurmembran-Form wird als photochromes Material für optische Anwendungen technisch genutzt. Weiter ist Bakteriorhodopsin in Purpurmembran-Form als Material mit photoelektrischen Eigenschaften von technischer Bedeutung.

Für diese technischen Anwendungen ist die kovalente Quervernetzung von Purpurmembranen untereinander vorteilhaft. Bei der Verwendung von Bakteriorhodopsin in der Photovoltaik werden pro Purpurmembranschicht etwa 300 mV erhalten. Durch die Bildung von mehreren Purpurmembran-

schichten übereinander mittels kovalenter Quervernetzung können Elemente erhalten werden, die höhere Spannungen liefern. Ein weiterer interessanter Aspekt ist die kovalente Kopplung von Purpurmbranen an Oberflächen, Polymere oder kleinere Moleküle, z.B. Farbstoffe.

5

Üblicherweise versucht man, für die kovalente Bindung von Purpurmbranen niedermolekulare Linkermoleküle, z.B. Glutaraldehyd, einzusetzen. Allerdings verlaufen diese Kopplungsreaktionen mit sehr schlechter Ausbeute. Der Grund dafür ist, dass nur wenige Aminosäuren von Bakteriorhodopsin außerhalb der Lipiddoppelschicht der Membran liegen, sterisch gehindert sind und nur schwer mit den niedermolekularen Kopplungsreagenzien reagieren. Niedermolekulare Kopplungsreagenzien haben aber noch einen weiteren gravierenden Nachteil. Sie können durch den Protonenkanal bis in das aktive Zentrum von Bakteriorhodopsin vordringen.

10

Insbesondere eine Reaktion der Linkermoleküle mit der Bindungsstelle des Retinalaldehyds an Lysin-216 (Schiff-Base) führt zu einer irreversiblen Schädigung der gewünschten Funktionen des Proteins. Deshalb sind die weit verbreiteten niedermolekularen Kopplungsreagenzien, die mit Aminogruppen reagieren, besonders nachteilig. Weiter müssen die niedermolekularen Linker im Überschuss zugegeben werden, um wenigstens eine einigermaßen akzeptable Ausbeute und Vernetzungsgeschwindigkeit zu erzielen. Eine Vielzahl nicht reagierter Moleküle bleibt im Material und müsste nach der Reaktion entfernt werden. Dies ist z.B. bei der Herstellung von optischen Filmen nicht möglich.

20

25

Die Nachteile niedermolekularer Linker sind im Folgenden kurz stichpunktartig zusammengefasst:

- Wenige Aminosäuren von Bakteriorhodopsin sind für Linker zugänglich.
- Linker, die mit funktionellen Aminogruppen reagieren, dürfen nicht eingesetzt werden.

30

- Nicht abreagierte Linker müssen entfernt werden, da sonst eine unkontrollierte, zeitlich lang andauernde Nachreaktion erfolgen wird, die zu einer stetigen Änderung der Materialeigenschaften und fehlender Langzeitstabilität führt.

5

Eine Aufgabe der Erfindung bestand somit darin, ein Verfahren zur kovalenten Verknüpfung von Bakteriorhodopsin in Membranform, insbesondere zur direkten Quervernetzung von Purpurmembranen, ohne Verwendung von niedermolekularen Linkern bereitzustellen. Ein weiterer Einsatzbereich ist die Kopplung von Bakteriorhodopsin in Membranform an Oberflächen, Polymere oder Hilfsstoffe, insbesondere Farbstoffe.

Diese Aufgabe wird durch ein Verfahren zur Herstellung von kovalent vernetztem Bakteriorhodopsin gelöst, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass Bakteriorhodopsin in membrangebundener Form als Substrat einer Transglutaminase, insbesondere einer bakteriellen Transglutaminase kovalent quervernetzt wird.

Unter dem Begriff Bakteriorhodopsin, wie er hierin verwendet wird, wird sowohl der Bakteriorhodopsin-Wildtyp (BR-WT) als auch Bakteriorhodopsin-Varianten verstanden. Der Begriff Bakteriorhodopsin-Varianten umfasst sowohl Bakteriorhodopsin-Moleküle, die sich von BR-WT durch Addition, Substitution, Deletion und/oder Insertion von Aminosäuren, insbesondere von mindestens einer, besonders bevorzugt von mindestens zwei, am meisten bevorzugt von mindestens drei, und bis zu 50, bevorzugt bis zu 20, und besonders bevorzugt bis zu 10 Aminosäuren unterscheiden. Weiterhin fallen unter den Begriff Varianten auch Bakteriorhodopsin-Moleküle, in denen Retinal durch retinalanaloge Moleküle ersetzt ist, sowie Bakteriorhodopsin-Moleküle, die chemisch modifiziert wurden, beispielsweise durch Einführen von Schutzgruppen oder funktionellen Seitengruppen.

Für die Zwecke dieser Erfindung umfasst der Ausdruck "Bakteriorhodopsin" auch strukturell mit Bakteriorhodopsin verwandte Membranproteine, die in membrangebundener Form vorliegen und eine Homologie von mindestens 70%, mehr bevorzugt mindestens 80%, am meisten bevorzugt mindestens 90%, zum Bakteriorhodopsin-Wildtyp aufweisen.

Homologie, wie hierin verwendet, wird definiert als

$$H (\%) = (1 - A/[BR-WT]) \times 100,$$

worin H die Homologie in Prozent bedeutet, A die Anzahl der gegenüber der Bakteriorhodopsin-Wildtypsequenz vorhandenen Änderungen darstellt und [BR-WT] die Anzahl der Aminosäuren der Bakteriorhodopsin-Wildtypsequenz ist.

Beispiele für strukturell mit Bakteriorhodopsin verwandte Membranproteine in membrangebundener Form, die von der Erfindung umfasst sind, sind Halorhodopsin sowie Sensorrhodopsin. Diese Membranproteine liegen in der Membranform nichtkristallin vor.

Erfindungsgemäß bevorzugt einzusetzende Bakteriorhodopsin-Materialien umfassen Bakteriorhodopsin-Wildtyp sowie Bakteriorhodopsin-Varianten mit einer veränderten Aminosäuresequenz. Bevorzugt weisen die Bakteriorhodopsin-Varianten eine modifizierte physikalische Funktion auf, insbesondere eine modifizierte Lichtempfindlichkeit, eine veränderte Farbe oder eine veränderte Kinetik des photochromen Verhaltens von Bakteriorhodopsin. Am meisten bevorzugt sind Bakteriorhodopsin-Varianten, bei denen gezielt Bindungsstellen für die enzymatische Quervernetzung mit Transglutaminase deletiert bzw. eingeführt sind. Besonders bevorzugt werden Bakteriorhodopsin-Varianten verwendet, bei denen Gln oder Lys deletiert oder durch andere Aminosäuren ausgetauscht sind. In Bakteriorhodopsin befindet sich eine Lys-Bindestelle intrazellulär (= C-Terminus) an den Positionen Lys41, Lys42, Lys159 und Lys172 sowie extrazellulär (N-Terminus) an Position Lys129. Gln-Bindungsstellen finden sich in Bakteriorhodopsin extrazellulär (= N-Terminus) an den Positionen Gln3

und Gln75. Es wurde festgestellt, dass insbesondere die Aminosäuren Gln3 und Lys129 als Bindestellen bei der Umsetzung mit Transglutaminase fungieren.

5 Weiterhin bevorzugt sind solche Bakteriorhodopsin-Varianten, bei denen in eine Schleife Gln oder Lys so eingeführt ist, dass es für Transglutaminase zugänglich ist. Besonders bevorzugt sind solche Bakteriorhodopsin-Varianten, bei denen eine oder zwei Bindungsstellen für Transglutaminase vorliegen. Bei Vorliegen von zwei Bindungsstellen, die für die Trans-

10 glutaminase zugänglich sind, können die beiden Bindungsstellen entweder auf der gleichen Membranseite oder bevorzugt auf unterschiedlichen Membranseiten angeordnet sein, d.h. eine Bindungsstelle auf der zytoplasmatischen Seite und eine auf der extrazellulären Seite. Auf diese Weise ist ein gerichtetes Übereinanderschichten von Membranen im

15 Gegensatz zu einer statistischen Quervernetzung möglich. Durch ein gerichtetes Übereinanderschichten können Elemente erzeugt werden, in denen sich die Spannung von 300 mV pro Schicht mit der Anzahl der Schichten erhöht. Bei bisher bekannten Verfahren zur Bildung von mehrschichtigen BR-Purpurmbranen wird lediglich eine Vorzugsorientierung

20 von etwa 10% erhalten. Erfindungsgemäß ist hingegen ein gerichtetes Übereinanderschichten mit einer deutlich höheren Vorzugsorientierung möglich. Bevorzugt werden etwa 4 bis 10 BR-Purpurmbran-Schichten übereinandergelagert, wobei eine Vorzugsorientierung um mehr als 30%, bevorzugt von mehr als 50% und besonders bevorzugt von mehr als

25 80% erhalten werden kann.

Weiterhin sind Bakteriorhodopsin-Varianten bevorzugt, in denen Retinal durch retinalanaloge Moleküle ersetzt ist, wodurch beispielsweise der Photozyklus des Bakteriorhodopsin-Materials verändert werden kann.

Retinalanaloge Moleküle sind Moleküle, die als Chromophor im Bakteriorhodopsin eingebaut werden können und sich von Retinal z.B. durch eine Derivatisierung unterscheiden.

- 5 Eine weitere bevorzugte Klasse von Bakteriorhodopsin-Materialien sind Bakteriorhodopsin-Varianten bzw. Bakteriorhodopsin-Wildtyp, die chemisch modifiziert wurden. Geeignete Modifizierungen sind beispielsweise im US-Patent 5,922,843 beschrieben. Die Varianten können auch durch Blockierung von Aminosäuren, beispielsweise durch Schutzgruppen oder
10 andere chemische Modifizierung der Aminosäureseitenketten modifiziert werden.

Bakteriorhodopsin-Varianten können auch durch enzymatische Vorbehandlung von Bakteriorhodopsin-Wildtyp bzw. Bakteriorhodopsin-Varianten erhalten werden. Eine enzymatische Spaltung kann beispielsweise
15 mittels Peptidasen herbeigeführt werden, wobei insbesondere der Amino-terminus entfernt wird oder Spaltungen in den außerhalb der Membran liegenden Schleifen ("Loops") herbeigeführt werden.

- 20 Es können auch Varianten eingesetzt werden, die eine Kombination von mehreren der oben genannten Modifikationen aufweisen.

Es hat sich überraschenderweise herausgestellt, dass Bakteriorhodopsin in membrangebundener Form und insbesondere in Purpurmembran-Form
25 ein Substrat der Transglutaminase und insbesondere der bakteriellen Transglutaminase (bTGA) ist. Dies ist insbesondere deshalb unerwartet, da, wie oben ausgeführt, die Aminosäuren des Bakteriorhodopsins in der Membranform, insbesondere in der Purpurmembran-Form, zum überwiegenden Teil innerhalb der Lipiddoppelschicht der Membran liegen und
30 somit nicht zugänglich sind. Das Bakteriorhodopsin liegt in der Purpurmembran-Form nicht in freier Form, sondern als übergeordnete, scheibenförmige Protein-Lipid-Kristallstruktur vor. Trotzdem wird es überraschen-

derweise von bakterieller Transglutaminase als Substrat angenommen und umgesetzt.

5 Bisher war lediglich bekannt, dass lösliche Proteine, wie etwa Enzyme, an einen Träger, beispielsweise an Gelatine oder ein Markerenzym, Transglutaminase-katalysiert gekoppelt werden können. Solch ein Verfahren wird z.B. in DE 197 32 917 C1 beschrieben. Dazu werden Proteinlösungen mit Transglutaminase umgesetzt. Einen Hinweis, dass wasserunlösliche Proteine oder gar wasserunlösliche Protein-Lipid-Aggregate als
10 Substrat von Transglutaminase angenommen werden, wird in DE 197 32 917 nicht offenbart. Noch viel weniger wird Bakteriorhodopsin oder gar Bakteriorhodopsin in Purpurmembran-Form in Erwägung gezogen.

15 Ein ähnliches Verfahren zur Umsetzung von wasserlöslichen Proteinen mit TGA, beispielsweise die Quervernetzung von Kasein oder Gelatine, wird auch in US 5,731,183 und US 5,948,662 beschrieben. Dazu werden Lösungen der Proteine mit den in diesen US-Patenten offenbarten speziellen Transglutaminasen umgesetzt. Eine Offenbarung oder einen
20 Hinweis darauf, dass auch wasserunlösliche Proteine oder gar übergeordnete Strukturen als Substrat für TGA dienen könnten, findet sich nicht. Noch viel weniger wird Bakteriorhodopsin oder gar Bakteriorhodopsin in Purpurmembran-Form erwähnt.

25 Es wurde nun überraschenderweise festgestellt, dass man mit Hilfe von TGA Bakteriorhodopsin in der Membranform und sogar in der Purpurmembran-Form direkt und ohne Hinzunahme niedermolekularer Linkermoleküle untereinander quervernetzen kann. Weiterhin können an das Bakteriorhodopsin Polymere, auch andere Substanzen, wie etwa Oberflächen oder Hilfsstoffe, z.B. Farbstoffe, gebunden werden. Die Quervernetzung findet bei etwa 40°C statt. Durch nachfolgende Erwärmung
30 des Reaktionsansatzes auf 80°C wird die TGA inaktiviert. Bakteriorho-

dopsin in Purpurmembran-Form übersteht die Wärmebehandlung unbeschadet. So kann die Reaktion gezielt gestoppt werden. Eine Entfernung von überschüssigen niedermolekularen Linkern ist nicht notwendig.

- 5 Bakteriorhodopsin-Purpurmembranen, insbesondere unterschiedliche Varianten von Bakteriorhodopsin-Purpurmembranen, können sowohl als erstes wie auch als zweites Substrat für TGA, insbesondere bTGA fungieren. Dadurch ergeben sich umfangreiche Möglichkeiten zur direkten Vernetzung von Purpurmembranen untereinander oder/und zur kovalenten
- 10 Kopplung von Polymeren, Oberflächen oder/und Substraten an Bakteriorhodopsin in Purpurmembran-Form sowohl in quervernetzter als auch in nicht-vernetzter Form.

- Ein Aspekt der Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur kovalenten
- 15 Verbindung von Bakteriorhodopsin in Membranform, insbesondere in Purpurmembran-Form an Polymere, Oberflächen oder/und Hilfsstoffe mittels TGA, wobei das Bakteriorhodopsin und das weitere Substrat mit einer Transglutaminase umgesetzt und miteinander kovalent verknüpft werden. Durch ein solches Verfahren können zum Beispiel kovalent
- 20 verknüpfte Konjugate bestehend aus Bakteriorhodopsin in Purpurmembran-Form und einem weiteren Molekül gebildet werden. Geeignete Polymere, an die Bakteriorhodopsin in Purpurmembran-Form mittels TGA kovalent gebunden werden kann, umfassen zum Beispiel Gelatine, Polyvinylalkohol und Polyethylen, die Seitengruppen-modifiziert sein
- 25 können. Geeignete Substrate oder Hilfsstoffe sind insbesondere niedermolekulare Verbindungen, wie etwa Farbstoffe.

Da erfindungsgemäß auf jegliche Linkermoleküle verzichtet werden kann, ergeben sich erhebliche wirtschaftliche und technologische Vorteile.

30 Neben den oben beschriebenen Bakteriorhodopsinen in membrangebundener Form kann erfindungsgemäß unter Verwendung einer Transglutami-

nase auch Bakteriorhodopsin in löslicher Form, insbesondere in monomerer oder trimerer Form, kovalent quervernetzt werden. Insbesondere kann Bakteriorhodopsin, wie es bei heterologer Expression von Bakteriorhodopsin gebildet wird, oder Bakteriorhodopsin, wie es durch Solubilisation von Purpurmembranen entsteht (monomerisiertes Bakteriorhodopsin), gemäß
5 dem Verfahren der Erfindung als Substrat einer Glutaminase umgesetzt und kovalent quervernetzt werden.

Darüber hinaus ist es erfindungsgemäß auch möglich, von Bakteriorhodopsin verschiedene Membranproteine als Substrat einer Transglutaminase umzusetzen und dabei kovalent quervernetzen, soweit sie in membrangebundener Form vorliegen. Insbesondere können Membranproteine, die mehrere, insbesondere vier bis acht helikale (vor allem α -helikale) membrandurchspannende Aminosäureabschnitte enthalten,
10 umgesetzt werden. Beispiele für geeignete Membranproteine sind Kanalproteine, Porter, Rezeptoren, G-Proteine usw.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann insbesondere verwendet werden, um zwei gleiche oder unterschiedliche Bakteriorhodopsin-Materialien, wie
20 sie oben beschrieben wurden, kovalent zu vernetzen. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird das erfindungsgemäße Verfahren eingesetzt, um ein Bakteriorhodopsin-Material kovalent an ein anderes Material zu binden. Bevorzugtes Beispiel hierfür ist die kovalente Bindung von Bakteriorhodopsin-Materialien, insbesondere Bakteriorhodopsin-
25 Materialien in Purpurmembran-Form an eine Oberfläche, an ein Polymer oder/und an eine niedermolekulare Verbindung (hierin auch als Hilfsstoff bezeichnet).

Zur kovalenten Bindung an eine Oberfläche wird das Bakteriorhodopsin
30 beispielsweise als Substrat der Transglutaminase umgesetzt, wobei als zweites Substrat ein Molekül verwendet wird, welches neben der Bindungsgruppe für die Transglutaminase eine weitere funktionelle Gruppe,

beispielsweise eine endständige Thiol-Gruppe, aufweist. Das bei der Umsetzung mit Transglutaminase gebildete Addukt kann dann über die eingeführte funktionelle Gruppe an eine Oberfläche immobilisiert werden. Bei Einbringung einer Thiol-Gruppe kann das Bakteriorhodopsin beispielsweise kovalent an eine Goldoberfläche immobilisiert werden. Dadurch ist es möglich, eine gerichtete Immobilisierung von Bakteriorhodopsin, insbesondere in der Purpormembran-Form, zu erreichen, da das Bakteriorhodopsin nur mit der Seite kovalent an die Oberfläche gebunden werden kann, auf der die Thiol-Gruppe eingeführt worden ist.

Daneben ist es auch möglich, Bakteriorhodopsin direkt an Oberflächen mittels Transglutaminase kovalent zu binden, soweit die Oberfläche Gruppen aufweist, die als Substrat der Transglutaminase wirken können.

Weiterhin ist es mit den erfindungsgemäßen Verfahren möglich, Bakteriorhodopsin an ein Polymer kovalent zu binden. Dabei wird ein Oligomer oder Polymer, welches natürlichen oder synthetischen Ursprungs sein kann, mit dem erfindungsgemäßen Verfahren mit Bakteriorhodopsin verknüpft. Ein Beispiel für ein natürliches Polymer ist Gelatine, ein Beispiel für ein bevorzugtes synthetisches Polymer ist Polyvinylalkohol. Voraussetzung für eine erfolgreiche Umsetzung ist, dass das Oligomer bzw. Polymer eine Seitengruppe enthält, die ein Substrat der Transglutaminase ist, also einen Glutamin(Gln)- oder einen Lysin(Lys)-Rest enthält oder ein Glutamin-Analogon oder ein Lysin-Analogon enthält oder einen Glutamin-Teilbereich oder einen Lysin-Teilbereich enthält, der von Transglutaminase als Substrat erkannt wird, insbesondere einen Teilbereich, der mindestens drei C-Atome und eine Aminogruppe umfasst.

Eine entsprechende Gruppe kann in dem Polymer bereits vorhanden sein, wie etwa in Gelatine, oder sie kann chemisch eingeführt werden.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erhält man ein Material, in dem Bakteriorhodopsin, insbesondere in der Purpurmembran-Form, an ein Polymer in stöchiometrischer Weise kovalent gekoppelt vorliegt. Bei der Verarbeitung eines Materials erhält man dadurch erhebliche Vorteile.

5 Insbesondere kann keine Entmischung auftreten, wie sie bei lediglich physikalisch vermischten Polymeren, die an sich ineinander nicht löslich sind, häufig auftritt. Weiterhin eröffnet sich die Möglichkeit, die Verarbeitung von Bakteriorhodopsin enthaltenden Materialien in organischen Lösungsmitteln durchzuführen, wenn das Bakteriorhodopsin an ein
10 Oligomer/Polymer gebunden wird, das sowohl in Wasser oder einem Puffer (für die enzymatische Quervernetzung) als auch in organischen Lösungsmitteln möglich ist.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird das Bakteriorhodopsin mit einem Oligomeren/Polymeren quervernetzt, welches seinerseits
15 noch weitere Polymerisierungsreaktionen oder Quervernetzungsreaktionen eingehen kann. Solche weiteren Quervernetzungs- bzw. Polymerisationsreaktionen können z.B. mit UV-Licht oder durch einen radikalischen Starter initiiert werden. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, Bulk-Materialien herzustellen, die ein homogen verteiltes Bakteriorhodopsin enthalten.
20 Solche Materialien können vorteilhafterweise zur Herstellung von Bakteriorhodopsin-Würfeln verwendet werden, wie sie für eine dreidimensionale Datenspeicherung eingesetzt werden können. Solche Materialien werden bisher durch Zumischung von Bakteriorhodopsin bei der Polymerisation von beispielsweise auf Acrylsäure oder Acrylamid basierende Polymeren in wässrigen Lösungsmitteln hergestellt, wobei keine kovalente
25 Quervernetzung zwischen dem Bakteriorhodopsin und dem Polymer ausgebildet wird. Bei der Entfernung des Wassers kommt es häufig zu hohem Schwund. Darüber hinaus werden bei solchen Materialien des
30 Standes der Technik Entmischungsphänomene beobachtet, die zu einer inhomogenen Verteilung des Bakteriorhodopsins in dem Material führen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird das Bakteriorhodopsin-Material an eine niedermolekulare Verbindung kovalent gebunden. Die niedermolekulare Verbindung ist dadurch gekennzeichnet, dass sie ein Substrat der Transglutaminase ist, also insbesondere ein Glutamin-
5 Analogon oder ein Lysin-Analogon. Die niedermolekulare Verbindung, die hierin auch Hilfsstoff genannt wird, kann ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus Farbstoffen, Fluorochromen, Lipiden, Peptiden, oligomeren und polymeren Nukleinsäuren, wie etwa DNA/RNA/PNA usw., synthetischen Oligomeren und Polymeren, Proteinen (Avidin-Biotin
10 etc.), Lektinen, Polysacchariden, leitfähigen Polymeren und anderen. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist eine gezielte, stöchiometrische, ortsselektive Ankopplung der Verbindungen an das Bakteriorhodopsin, insbesondere an Bakteriorhodopsin in Purpurmembran-Form, möglich.

15 Farbstoffe und Fluorochrome werden insbesondere kovalent angekoppelt, um eine Änderung des Anfangsfarbzustandes des Bakteriorhodopsins bzw. der Purpurmembran zu erzielen. Vorteilhaft ist dabei, dass keine Entmischung zwischen Bakteriorhodopsin und Farbstoff bzw. Fluorochrom auftritt und dass die Verarbeitung nicht durch unterschiedliche
20 Löslichkeiten der Materialien nachteilig beeinflusst wird.

Lipide können kovalent angekoppelt werden, um eine Verankerung von Bakteriorhodopsin, insbesondere in Membranform, auf einer anderen Lipidmembran zu erhalten, wobei die weitere Membran bevorzugt eben-
25 falls eine Purpurmembran und besonders bevorzugt ebenfalls eine Bakteriorhodopsin-Purpurmembran darstellt. Lipidgekoppelte Bakteriorhodopsin-Materialien können weiterhin vorteilhaft in der Langmuir-Blodgett-Technik eingesetzt werden.

30 Durch die Kopplung von Bakteriorhodopsin mit Peptiden können immunologische Tags eingebracht werden und Materialien mit selektiver, hoch-

affiner Bindefähigkeit (z.B. Antigen-Antikörper-Wechselwirkung) erhalten werden.

Durch die Kopplung von Bakteriorhodopsin mit Oligomeren, insbesondere oligomeren oder polymeren Nukleinsäuren, wie etwa DNA, RNA, PNA usw., ist der Aufbau dreidimensionaler gerichteter Strukturen möglich.

Durch die kovalente Kopplung von Bakteriorhodopsin mit synthetischen Oligomeren bzw. Polymeren können quervernetzte Materialien erhalten werden, die gegen Entmischung stabil sind.

Durch die kovalente Kopplung von Proteinen, wie etwa Avidin, Biotin oder ähnlichen, die insbesondere ein Partner eines selektiven, hoch-affinen Bindungspaares sind, können Materialien mit hoher Komplexbildungskonstante erhalten werden.

Als leitfähige Materialien werden bevorzugt Protonen-leitfähige Materialien, wie etwa Protonen-leitfähige Polymere, oder Membranen mit dem Bakteriorhodopsin gekoppelt.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein linkerfrei kovalent vernetztes Bakteriorhodopsin, welches durch die oben beschriebenen Vorgehensweisen erhalten werden kann. Ein solches Material, welches ausschließlich aus Bakteriorhodopsin oder aus Bakteriorhodopsin und daran kovalent gebundenen weiteren Materialien bzw. Stoffen aufgebaut sein kann, weist gegenüber bekannten Bakteriorhodopsin-Materialien strukturelle Unterschiede auf, die erhebliche Vorteile liefern. Bei der erfindungsgemäßen direkten Kopplung wird kein Linker eingeschaltet, so dass auch in dem erhaltenen Material die Bakteriorhodopsin-Materialien direkt gebunden und nicht über Linker vernetzt sind. Dadurch können die mit der Verwendung von Linkern verbundenen Nachteile, wie sie oben beschrieben wurden, ausgeschaltet werden. Bei

der Kopplung von Bakteriorhodopsin an andere Materialien wird durch die kovalenten Bindungen im Gegensatz zu im Stand der Technik bekannten physikalischen Mischungen zudem erreicht, dass stabile, homogene Werkstoffe erhalten werden können. Solche Werkstoffe sind insbesondere zur Verwendung in der Datenspeicherung geeignet. Durch die gerichtete Anordnung von mehreren Schichten von BR-Purpurmembranen mit einer hohen Vorzugsorientierung können Materialien erhalten werden, die bei photoelektrischen Anwendungen, wie sie z.B. bei F. Hong, Progress in Surface Science 62 (1999), 1-237, beschrieben werden, ein verbessertes Verhalten zeigen. Solche Materialien erzeugen höhere Spannungen bei Belichtung als bekannte, weniger gut ausgerichtete BR-Materialien und können insbesondere als Schalter oder als Steuerelemente eingesetzt werden.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele und die Figuren weiter erläutert, wobei Fig. 1 eine schematische Darstellung der Ergebnisse einer Zuckerdichte-Gradientenzentrifugation ist. Fig. 1A zeigt Bakteriorhodopsin Wildtyp (BR-WT), Fig. 1B die Bakteriorhodopsin-Variante BR-D2N und Fig. 1C miteinander quervernetztes BR-WT und BR-D2N nach 24 Stunden Inkubation mit BTGase (bakterielle Transglutaminase).

Fig. 2 zeigt eine schematische Darstellung von SDS-PAGE. A) BR-WT; B) BR-WT + BTGase, 0 Stunden inkubiert bei 37°C; C) BR-WT + BTGase, 10 Minuten inkubiert bei 37°C; D) BR-WT + BTGase, 20 Minuten inkubiert bei 37°C; E) BR-WT + BTGase, 120 Minuten inkubiert bei 37°C.

Fig. 3 zeigt die Ausbildung von Vernetzungsprodukten von BR-WT und BR-D2N in Gegenwart von bakterieller Transglutaminase in Abhängigkeit der Zeit.

Fig. 4 zeigt die Sequenz von Bakteriorhodopsin mit der transmembranen Anordnung, modifiziert nach R.R. Birge, Photophysics and Molecular Electronic Applications of the Rhodopsins, Annu. Rev. Phys. Chem. 41 (1990), 683-733.

5

Fig. 5 zeigt ein Beispiel für eine gerichtete Abscheidung von Bakteriorhodopsin in Membranform auf Oberflächen. Auf einem Wafer 1 ist eine Gold enthaltende Schicht 2 aufgebracht. Diese Oberfläche wird mit in einem Lösungsmittel suspendierten Bakteriorhodopsin-Purpurmemb-
10 ranen 3 in Kontakt gebracht, die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren Thiol-modifiziert wurden. Es findet eine Selbstorganisation 4 der Purpurmemb-
ranen in gerichteter Weise auf der Goldoberfläche statt. Purpurmemb-
ranen mit falscher Orientierung 5 werden nicht an die Oberfläche gebunden.

15

Fig. 6 zeigt ein Beispiel für eine dreidimensionale Strukturierung von Bakteriorhodopsin-Purpurmembbranen. Auf eine Oberfläche oder ein Substrat 6 wird eine Haftschrift 7, z.B. Nukleinsäure-Oligomere, aufgebracht. Die Purpurmembbranen 8 werden mit funktionellen Gruppen derart
20 modifiziert, dass die auf der einen Seite der Purpurmembbran-Form angebrachten funktionellen Gruppen jeweils mit den auf der anderen Seite einer weiteren Purpurmembbran aufgetragenen funktionellen Gruppen wechselwirken können. Beispielsweise wird die Purpurmembbran mit
25 Nukleinsäure-Oligomeren derart modifiziert, dass die Oligomere auf beiden Seiten miteinander hybridisieren können, also die Purpurmembbran-extrazellulär mit der Purpurmembbran-zytoplasmatisch hybridisieren kann. Auf diese Weise erfolgt eine gerichtete Bindung 9 von Purpurmembbranen an Substrat und eine gerichtete Selbstorganisation der Purpurmembbranen in die dritte Dimension. Auf diese Weise kann eine stark orientierte,
30 anisotrope Schichtstruktur erhalten werden. Die von den einzelnen Purpurmembbran-Formen erzeugten Photospannungen kompensieren sich jetzt nicht mehr, wie es bei einer willkürlichen Anordnung der Fall ist,

sondern addieren sich. Auf diese Weise können Elemente mit einer einstellbaren Photospannung erhalten werden, welche theoretisch etwa $300 \text{ mV} \times \text{Anzahl der Schichten}$ beträgt.

5 Fig. 7 zeigt Purpurmembranen (gestrichelt dargestellt) mit eingebetteten Bakteriorhodopsin-Aminosäuresäulen (schematisch als durchgezogene Kästchen dargestellt). Lysin (Lys) und Glutamin (Gln), die von Transglutaminase (TGA) akzeptiert werden, sind als ausgefüllte Kreise (Lys) bzw. ausgefüllte Quadrate (Gln) eingezeichnet.

10

Bei Bakteriorhodopsin-Wildtyp liegen die Bindungsstellen, die für Transglutaminase zugänglich sind, nämlich Gln3 und K129, auf der gleichen Seite der Membran (Fig. 7A). In einer bevorzugten Ausführungsform wird eine Bakteriorhodopsin-Variante verwendet, die je eine Bindungsstelle auf der Innen- und eine auf der Außenseite der Membran, d.h. eine Bindungsstelle auf der zytoplasmatischen Membranseite und eine Bindungsstelle auf der extrazellulären Membranseite aufweist. Eine solche Variante wird bevorzugt dadurch erhalten, dass das Lys129 unverändert gelassen wird und das Gln3 deletiert wird und stattdessen ein Gln in einer Schleife auf der anderen Seite der Membran eingebracht wird (Fig. 7B). In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird eine Bakteriorhodopsin-Variante verwendet, welche genau eine Bindungsstelle (innen oder außen) aufweist, welche beispielsweise durch Entfernen der anderen möglichen Bindungsstellen erhalten werden kann (Fig. 7C).

20

25

Beispiele:

Beispiel 1)

30

5 ml einer 42,5%- und 37,5%-Zuckerlösung werden verwendet, um mit einem herkömmlichen Gradientenmischer einen linearen Zuckergradienten zu erzeugen. Dieser Gradient dient zur Analyse von vernetztem und unvernetztem Bakteriorhodopsin.

Beispiel 2)

Eine Bakteriorhodopsin-Wildtype-(WT)-Lösung (20 mg/ml) und eine Lösung der Bakteriorhodopsin-Variante BR-DZN (20 mg/ml) werden mit Puffer (pH 7,0, 100 mM, Phosphatpuffer) und BTGase-(9,3 U/ml)-Lösung gemischt, so dass die BTGase im Vergleich zu Bakteriorhodopsin im vierfachen Überschuss vorliegt. Die Inkubation erfolgt für 24 h bei 40°C. In der Reaktionsmischung liegt dann praktisch nur noch quervernetztes Bakteriorhodopsin vor (Abb. 1c).

10 Beispiel 3)

Reaktionsansatz wie bei 2). Die Reaktion wird allerdings zu einem beliebigen Zeitpunkt durch kurzfristiges Erwärmen auf 80°C gestoppt. In der Reaktionsmischung liegt dann quervernetztes und nicht quervernetztes Bakteriorhodopsin vor. Durch die Wahl des Stoppzeitpunktes können beliebige Verhältnisse zwischen vernetztem und unvernetztem Bakteriorhodopsin eingestellt werden (Abb. 2 und 3). Je höher der Vernetzungsgrad ist, desto starrer wird das quervernetzte Bakteriorhodopsin.

Die rote Bande in Abb. 3 stellt BR-WT dar, die blaue Bande BR-D2N.

20 Durch Quervernetzung wird das lilafarbige Vernetzungsprodukt $BR-WT_x-
BR-D2N_y$ erhalten.

25 Beispiel 4)

Eine Gelatinelösung (Schweineschwartengelatine), 10% (w/v) wird mit dem gleichen Volumen einer BR-Lösung (PM-Konzentration 39,1 mg/ml) und mit BTGase Lösung (12 U/ml) versetzt, so dass die Menge der BTGase mit der Menge des BR's vergleichbar ist. Die Reaktionslösung wird dann bei 37°C über Nacht inkubiert. In der Reaktionsmischung liegt das BR dann in Gelatine gebunden vor.

Ansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von kovalent vernetztem Bakteriorhodopsin,
dadurch gekennzeichnet, dass Bakteriorhodopsin in membrangebundener Form als Substrat einer Transglutaminase umgesetzt und dabei kovalent quervernetzt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, dass Bakteriorhodopsin in der Purpurmembran-Form als Substrat einer Transglutaminase umgesetzt und dabei kovalent quervernetzt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet, dass gleiche oder unterschiedliche Bakteriorhodopsine oder Bakteriorhodopsin-Varianten miteinander vernetzt werden.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass das Bakteriorhodopsin ausgewählt wird aus Bakteriorhodopsin-Wildtyp oder/und Bakteriorhodopsin-Varianten.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eine Bakteriorhodopsin-Variante umgesetzt wird, bei der es sich um ein strukturell mit Bakteriorhodopsin verwandtes Membranprotein, insbesondere Halorhodopsin oder/und Sensorrhodopsin, in membrangebundener Form handelt.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eine Bakteriorhodopsin-Variante umgesetzt wird, die eine gegenüber dem Bakteriorhodopsin-Wildtyp veränderte Aminosäuresequenz aufweist oder/und bei der Retinal durch ein Retinal-analoges Molekül ersetzt ist oder/und die chemisch oder/und durch enzymatische Behandlung modifiziert ist.

- 5 7. Verfahren nach Anspruch 6,
dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eine Bakteriorhodopsin-Variante umgesetzt wird, die nur eine einzige Bindungsstelle für Transglutaminase enthält.
- 10 8. Verfahren nach Anspruch 6,
dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eine Bakteriorhodopsin-Variante umgesetzt wird, die zwei Bindungsstellen für Transglutaminase enthält, die nicht auf der gleichen Membranseite liegen.
- 15 9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass die Quervernetzungsreaktion durch kurzfristiges Erwärmen auf 80°C oder darüber gestoppt wird.
- 20 10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass eine bakterielle Transglutaminase verwendet wird.
- 25 11. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass eine Transglutaminase verwendet wird, die ohne Cofaktor aktiv ist.
- 30 12. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet, dass das Bakteriorhodopsin mit einem Polymeren, einer Oberfläche oder/und einem Hilfsstoff quervernetzt wird.

- 5 13. Verfahren nach Anspruch 12,
dadurch gekennzeichnet, dass der Hilfsstoff ausgewählt wird aus
der Gruppe bestehend aus Farbstoffen, Fluorochromen, Lipiden,
Peptiden, Nukleinsäuren, synthetischen Oligomeren und Polyme-
ren, Proteinen, Lektinen, Polysacchariden und leitfähigen Molekü-
10 len.

14. Linkerfrei kovalent vernetztes Bakteriorhodopsin, erhältlich nach
einem der vorhergehenden Ansprüche.

- 15 15. Verwendung des linkerfrei kovalent vernetzten Bakteriorhodopsins
nach Anspruch 14 für photoelektrische Anwendungen.

16. Verwendung des linkerfrei kovalent vernetzten Bakteriorhodopsins
nach Anspruch 14 zur dreidimensionalen Datenspeicherung.

Fig. 1

Lineare Zuckergradienten



A



B



C

37,5 %



42,5 %



Fig. 2

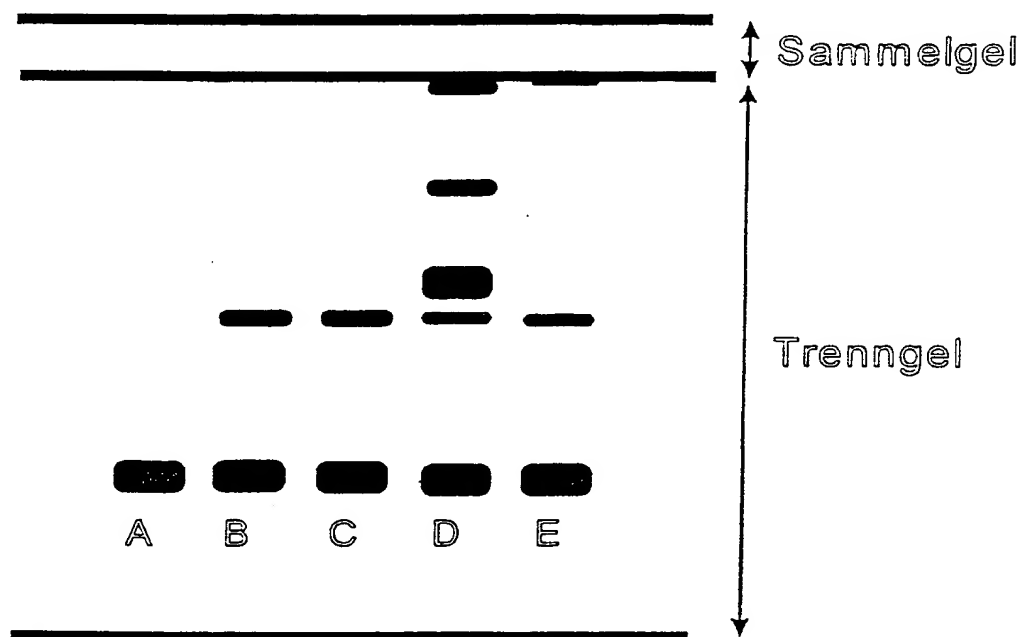




Fig. 3

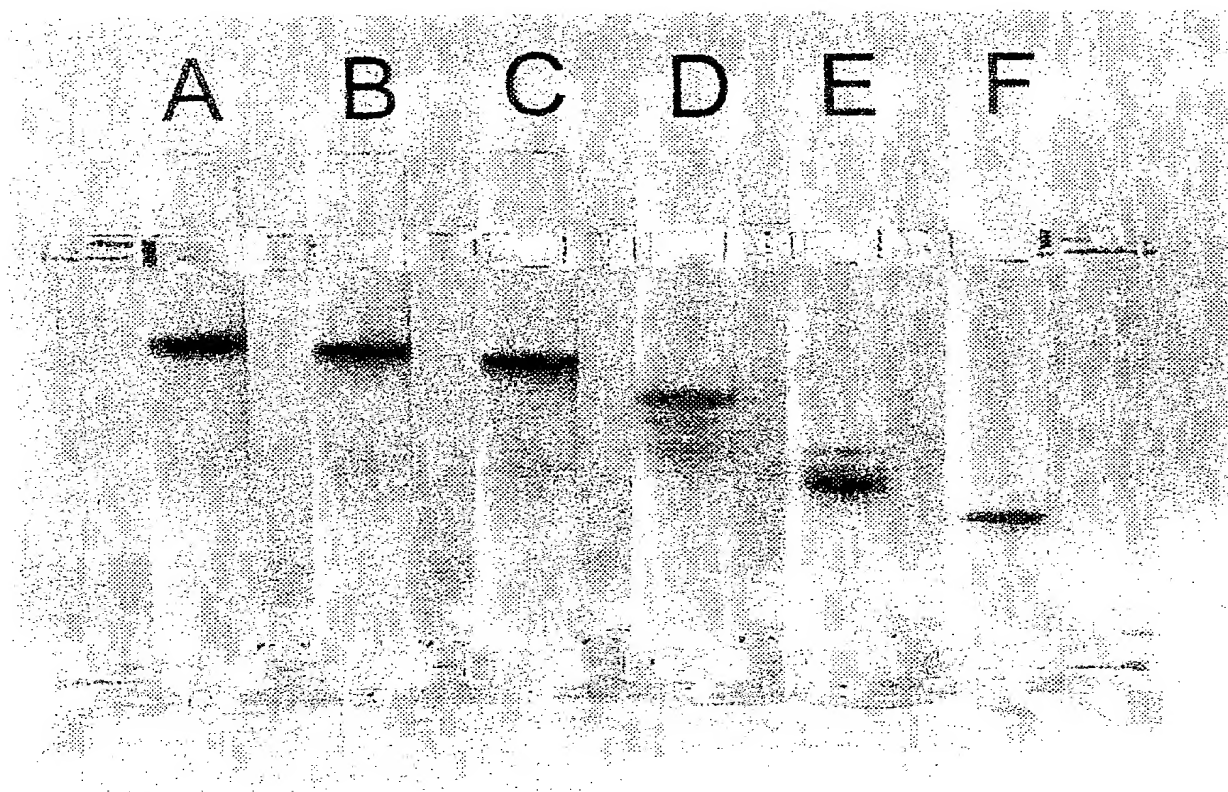






Fig. 5

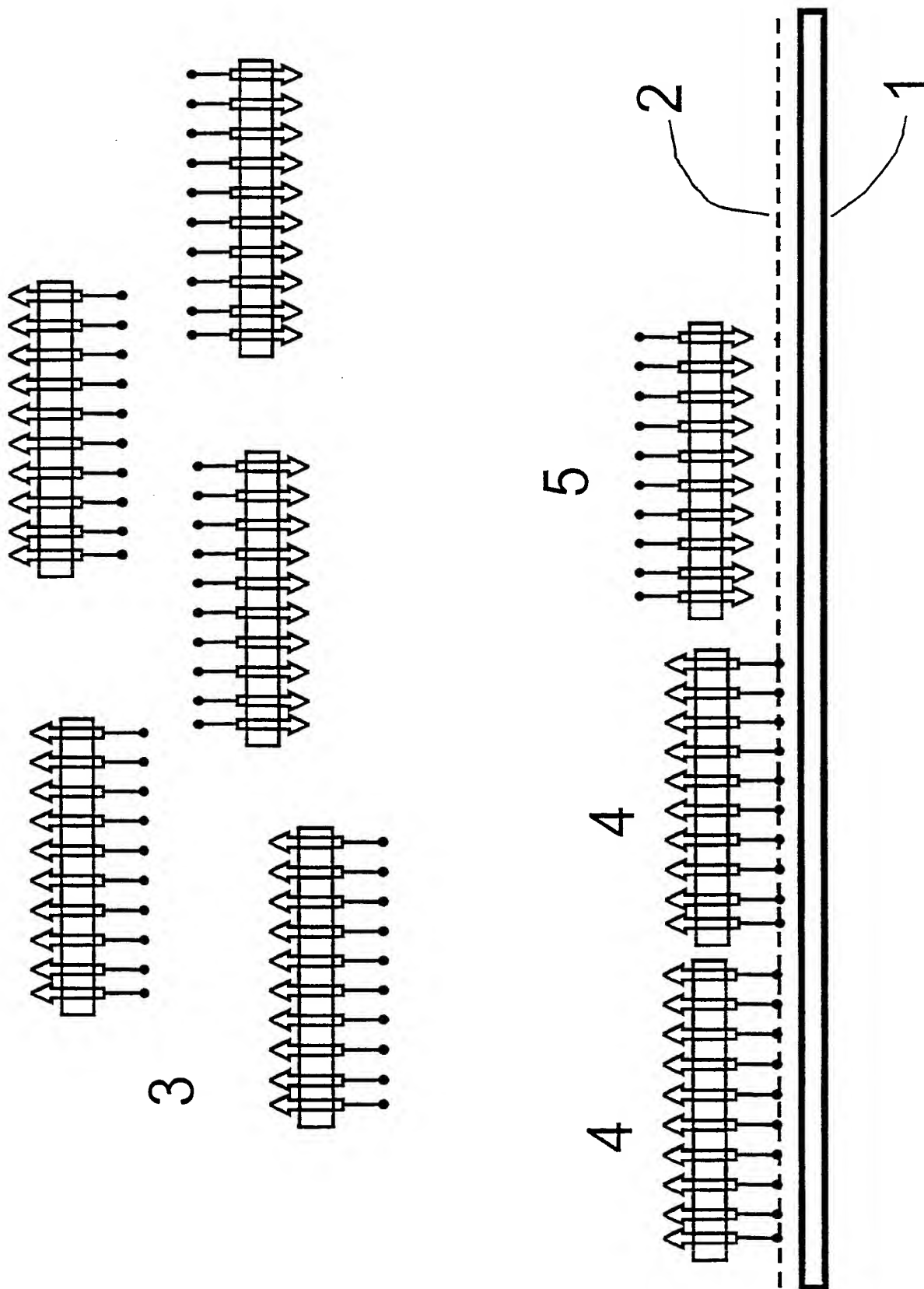




Fig. 6

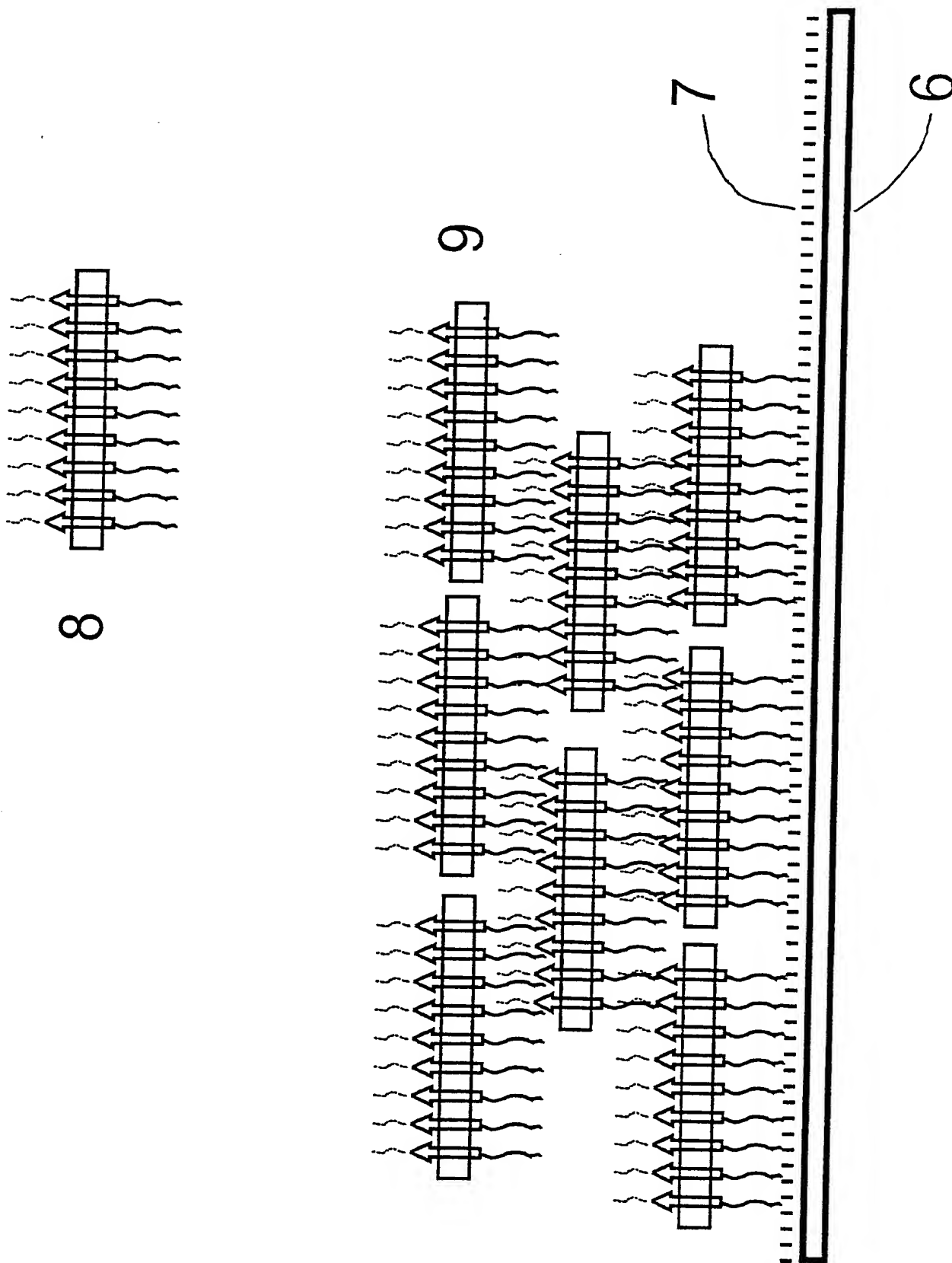
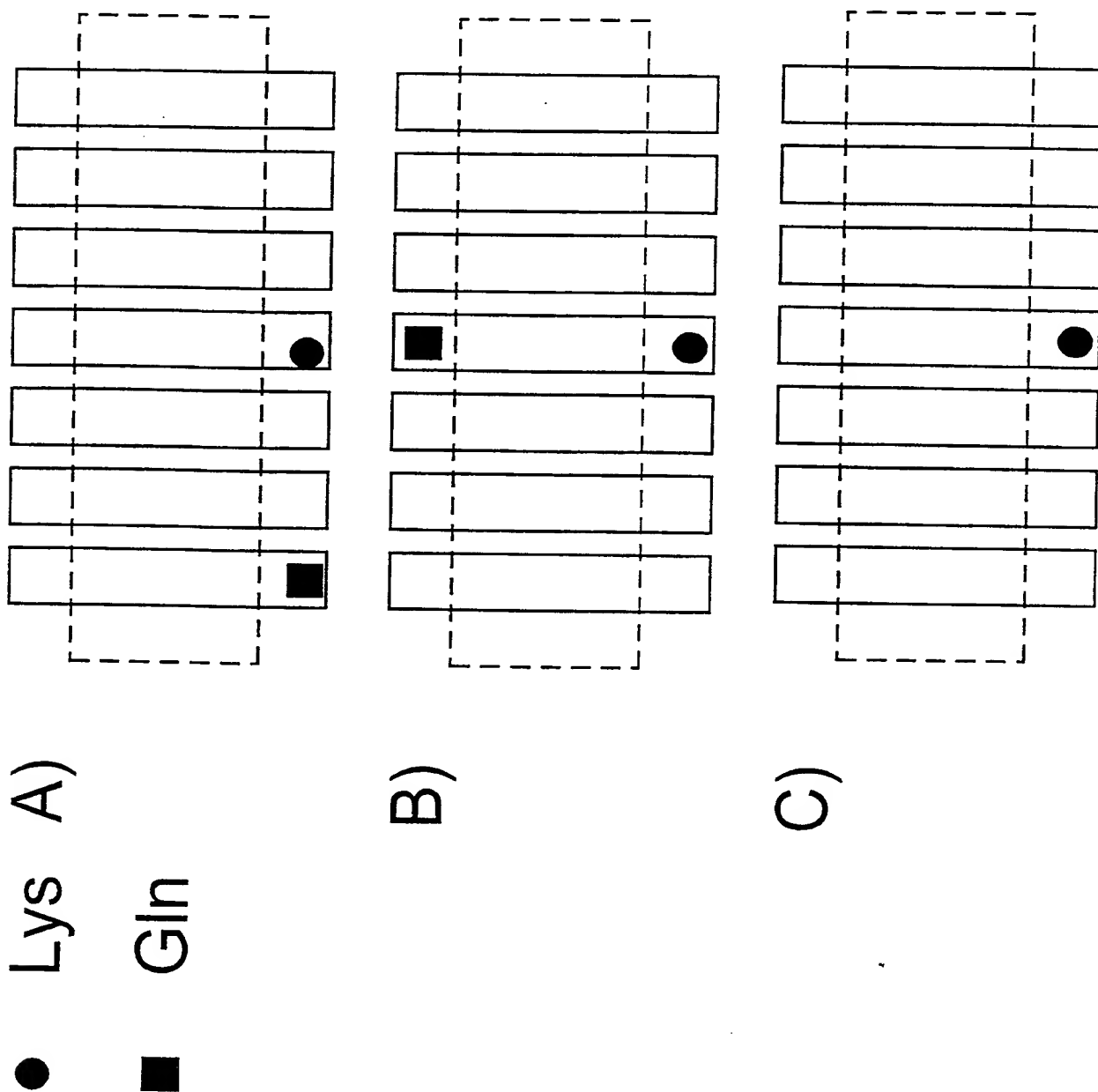




Fig. 7





INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Intel: ☐ Aktenzeichen

PCT/EP 00/02904

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 C12N11/02 C07K14/215 C07K17/02

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RESEARCHIERTE GEBIETE
 Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 IPK 7 C12N C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
 EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CAB Data, STRAND

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 417 541 A (HITACHI LTD) 20. März 1991 (1991-03-20) das ganze Dokument	1-16
A	B.J. GAFFNEY: "Chemical and biochemical crosslinking of membrane components" BIOCHIMICA BIOPHYSICA ACTA, Bd. 822, 1985, Seiten 289-317, XP000863159 ELSEVIER SCIENCE, AMSTERDAM, NL Seite 304, linke Spalte, Zeile 35 -rechte Spalte, Zeile 25 Seite 311, linke Spalte, Zeile 15 - Zeile 31	1-16
A	WO 99 06446 A (EYMAN ROLF ;BECHTOLD UWE (DE); OTTERBACH JENS (DE); PASTERNAK RA) 11. Februar 1999 (1999-02-11) das ganze Dokument	1-16

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
 - *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
 - *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
 - *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
 - *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

4. August 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

11/08/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hornig, H

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/02904

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 532 029 A (CONSORTIUM ELEKTROCHEM IND) 17. März 1993 (1993-03-17) das ganze Dokument	1-16
A	--- SINGH A K ET AL: "Photoactive bacteriorhodopsin variants" RADIATION PHYSICS AND CHEMISTRY, NL, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., AMSTERDAM, Bd. 49, Nr. 1, 1997, Seiten 131-134, XP004014865 ISSN: 0969-806X das ganze Dokument	1-16
A	--- BRAUCHLE C ET AL: "OPTICAL APPLICATIONS OF BACTERIORHODOPSIN AND ITS MUTATED VARIANTS" ADVANCED MATERIALS, DE, VCH VERLAGSGESELLSCHAFT, WEINHEIM, Bd. 3, Nr. 9, 1. September 1991 (1991-09-01), Seiten 420-428, XP000329344 ISSN: 0935-9648 das ganze Dokument	1-16
A	--- BRAEUCHLE C ET AL: "OPTICAL INFORMATION PROCESSING WITH BACTERIORHODOPSIN AND ITS GENETICALLY MODIFIED VARIANTS" PROCEEDINGS OF THE QUANTUM ELECTRONICS AND LASER SCIENCE CONFERENCE, US, NEW YORK, IEEE, Bd. CONF. 4, 2. Mai 1993 (1993-05-02), Seite 2 XP000376687 ISBN: 1-55752-301-0 Abstract no. QMA3; Zusammenfassung	1-16
A	--- EP 0 726 317 A (AJINOMOTO KK) 14. August 1996 (1996-08-14) das ganze Dokument	1-16
P, A	--- US 5 922 843 A (TAN ERIC HOCK LYE ET AL) 13. Juli 1999 (1999-07-13) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-16

INTERNATIONALER RESEARCHBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/02904

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0417541 A	20-03-1991	JP 3083999 A US 5252719 A	09-04-1991 12-10-1993
WO 9906446 A	11-02-1999	DE 19732917 C EP 1001992 A	15-10-1998 24-05-2000
EP 0532029 A	17-03-1993	DE 4130380 A CA 2078097 A DE 59200141 D JP 2718863 B JP 5249874 A US 5374492 A	18-03-1993 13-03-1993 01-06-1994 25-02-1998 28-09-1993 20-12-1994
EP 0726317 A	14-08-1996	JP 9131180 A AU 691714 B AU 4337196 A CA 2169249 A CN 1142536 A US 5731183 A US 5948662 A	20-05-1997 21-05-1998 15-08-1996 10-08-1996 12-02-1997 24-03-1998 07-09-1999
US 5922843 A	13-07-1999	KEINE	



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/02904

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N11/02 C07K14/215 C07K17/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CAB Data, STRAND

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 417 541 A (HITACHI LTD) 20 March 1991 (1991-03-20) the whole document	1-16
A	B.J. GAFFNEY: "Chemical and biochemical crosslinking of membrane components" BIOCHIMICA BIOPHYSICA ACTA, vol. 822, 1985, pages 289-317, XP000863159 ELSEVIER SCIENCE, AMSTERDAM, NL page 304, left-hand column, line 35 -right-hand column, line 25 page 311, left-hand column, line 15 - line 31	1-16
A	WO 99 06446 A (EYMANN ROLF ; BECHTOLD UWE (DE); OTTERBACH JENS (DE); PASTERNAK RA) 11 February 1999 (1999-02-11) the whole document	1-16

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 August 2000

Date of mailing of the international search report

11/08/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Hornig, H

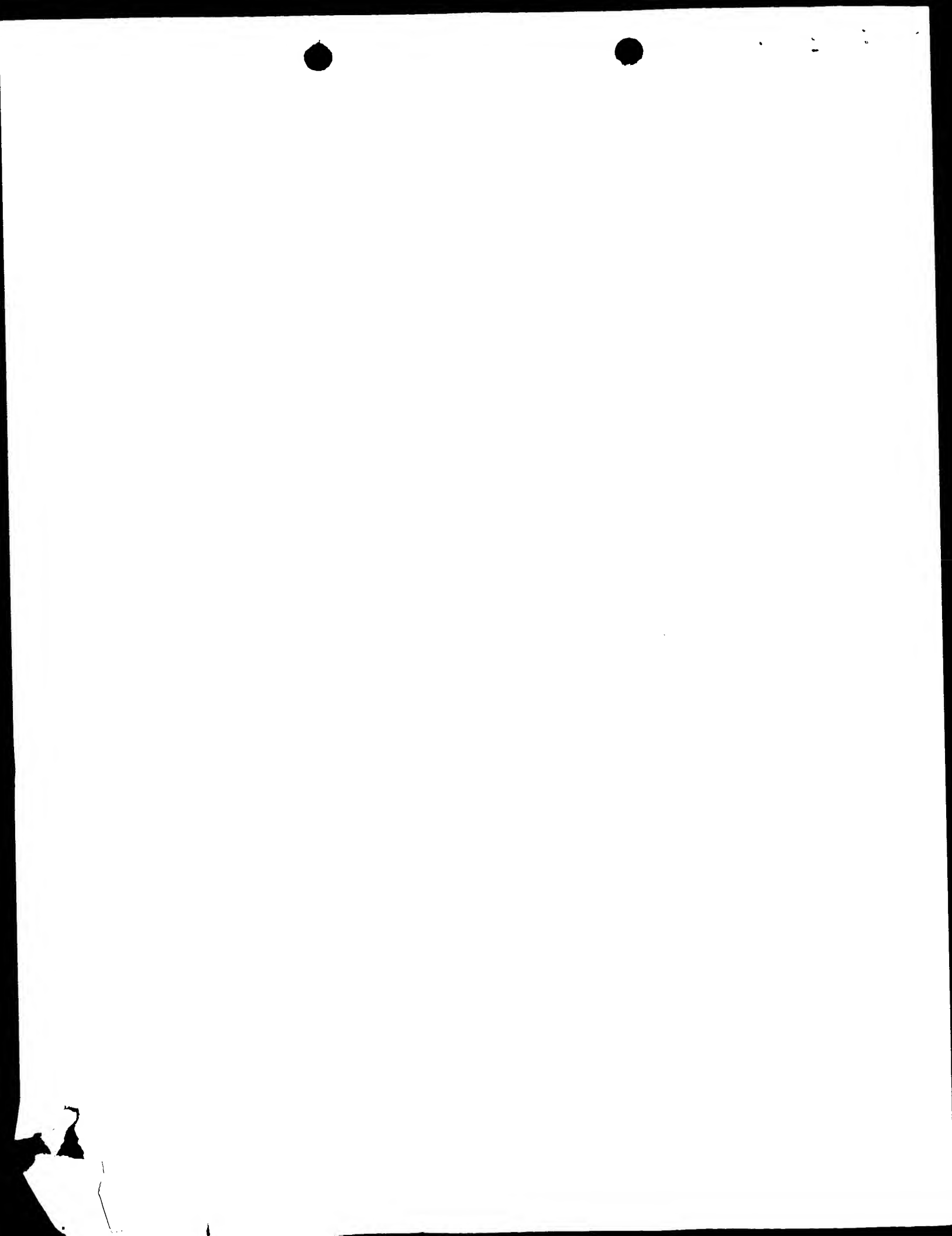
INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/02904

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 532 029 A (CONSORTIUM ELEKTROCHEM IND) 17 March 1993 (1993-03-17) the whole document	1-16
A	----- SINGH A K ET AL: "Photoactive bacteriorhodopsin variants" RADIATION PHYSICS AND CHEMISTRY, NL, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., AMSTERDAM, vol. 49, no. 1, 1997, pages 131-134, XP004014865 ISSN: 0969-806X the whole document	1-16
A	----- BRAUCHLE C ET AL: "OPTICAL APPLICATIONS OF BACTERIORHODOPSIN AND ITS MUTATED VARIANTS" ADVANCED MATERIALS, DE, VCH VERLAGSGESELLSCHAFT, WEINHEIM, vol. 3, no. 9, 1 September 1991 (1991-09-01), pages 420-428, XP000329344 ISSN: 0935-9648 the whole document	1-16
A	----- BRAEUCHLE C ET AL: "OPTICAL INFORMATION PROCESSING WITH BACTERIORHODOPSIN AND ITS GENETICALLY MODIFIED VARIANTS" PROCEEDINGS OF THE QUANTUM ELECTRONICS AND LASER SCIENCE CONFERENCE, US, NEW YORK, IEEE, vol. CONF. 4, 2 May 1993 (1993-05-02), page 2 XP000376687 ISBN: 1-55752-301-0 Abstract no. QMA3; abstract	1-16
A	----- EP 0 726 317 A (AJINOMOTO KK) 14 August 1996 (1996-08-14) the whole document	1-16
P, A	----- US 5 922 843 A (TAN ERIC HOCK LYE ET AL) 13 July 1999 (1999-07-13) cited in the application the whole document	1-16



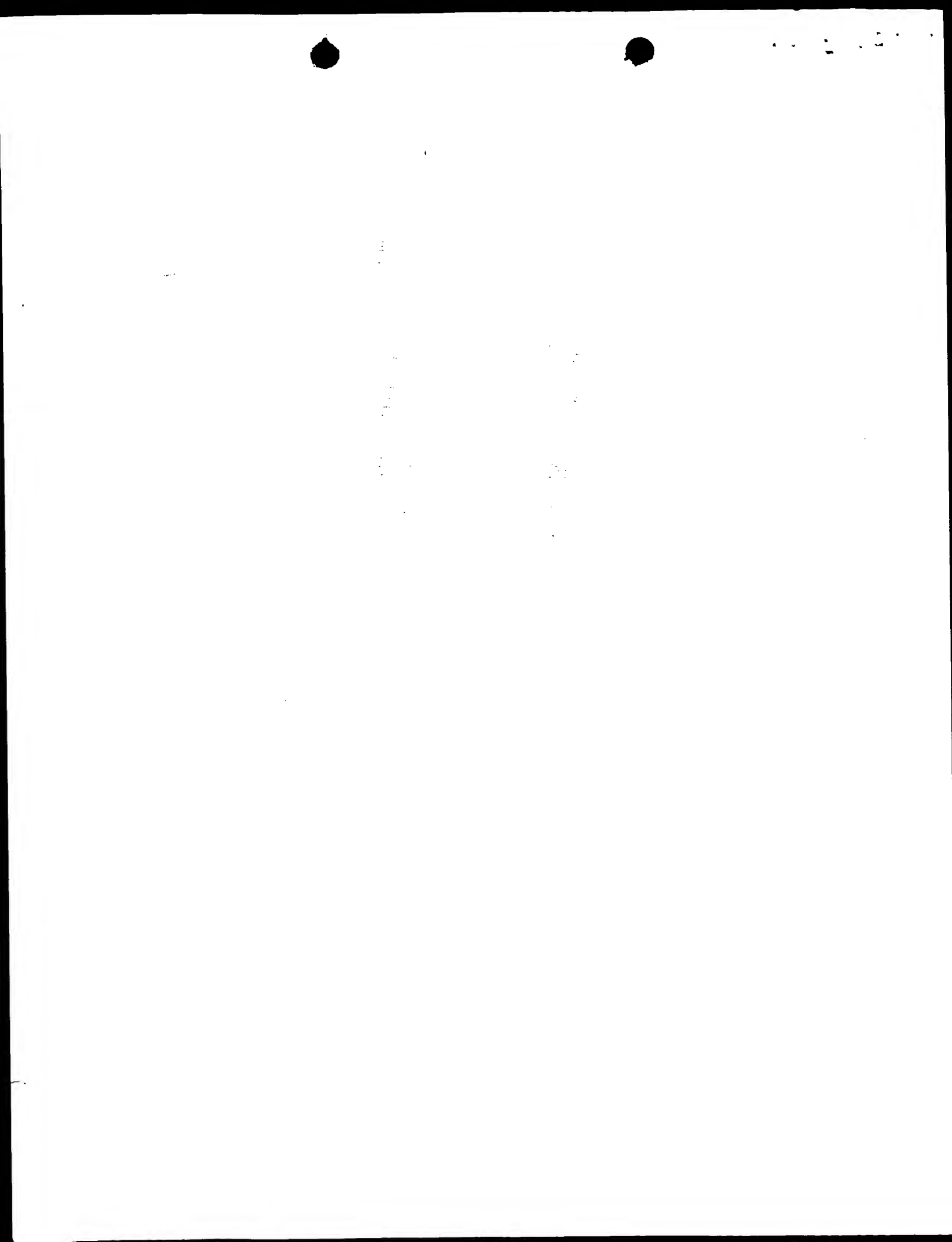
INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/02904

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0417541 A	20-03-1991	JP 3083999 A US 5252719 A	09-04-1991 12-10-1993
WO 9906446 A	11-02-1999	DE 19732917 C EP 1001992 A	15-10-1998 24-05-2000
EP 0532029 A	17-03-1993	DE 4130380 A CA 2078097 A DE 59200141 D JP 2718863 B JP 5249874 A US 5374492 A	18-03-1993 13-03-1993 01-06-1994 25-02-1998 28-09-1993 20-12-1994
EP 0726317 A	14-08-1996	JP 9131180 A AU 691714 B AU 4337196 A CA 2169249 A CN 1142536 A US 5731183 A US 5948662 A	20-05-1997 21-05-1998 15-08-1996 10-08-1996 12-02-1997 24-03-1998 07-09-1999
US 5922843 A	13-07-1999	NONE	



0
Translation

09/937754

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

10

Applicant's or agent's file reference 21520P WO	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP00/02904	International filing date (day/month/year) 31 March 2000 (31.03.00)	Priority date (day/month/year) 31 March 1999 (31.03.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 11/02		
Applicant HAMPP, Norbert		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 8 sheets, including this cover sheet.

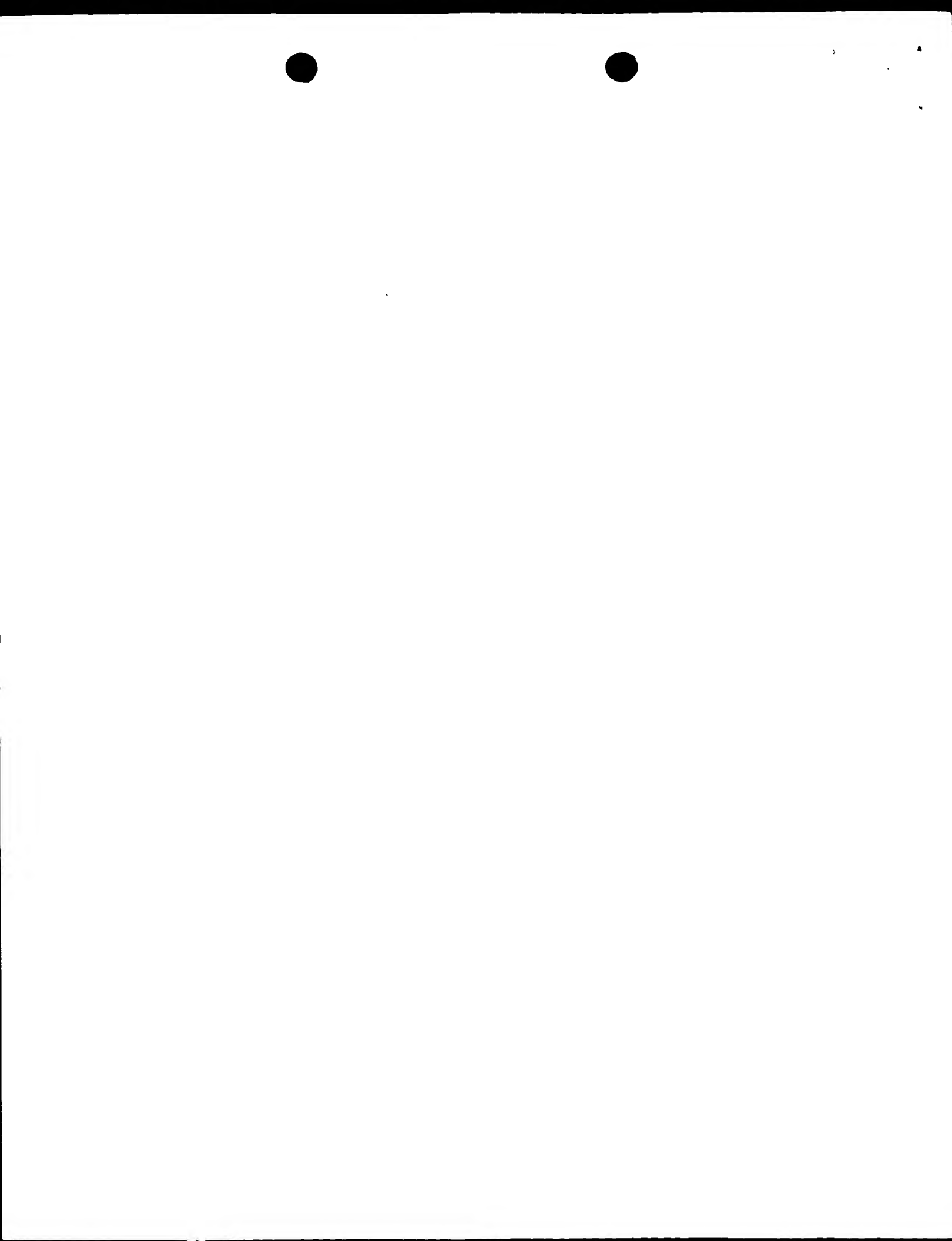
☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☒ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☒ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 25 September 2000 (25.09.00)	Date of completion of this report 05 July 2001 (05.07.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP00/02904

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-17, as originally filed,
pages _____, filed with the demand,
pages _____, filed with the letter of _____,
pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. 1-16, as originally filed,
Nos. _____, as amended under Article 19,
Nos. _____, filed with the demand,
Nos. _____, filed with the letter of _____,
Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/7-7/7, as originally filed,
sheets/fig _____, filed with the demand,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

national application No.

PCT/EP00/02904

II. Priority

1. ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the failure to furnish within the prescribed time limit the requested:
- ☐ copy of the earlier application whose priority has been claimed.
 - ☐ translation of the earlier application whose priority has been claimed.
2. ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid.

Thus for the purposes of this report, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.

3. Additional observations, if necessary:

SEE SUPPLEMENTAL SHEET.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

national application No.

PCT/EP00/02904

IV. Lack of unity of invention

1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:

- ☐ restricted the claims.
- ☐ paid additional fees.
- ☐ paid additional fees under protest.
- ☐ neither restricted nor paid additional fees.

2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is

- ☐ complied with.
- ☐ not complied with for the following reasons:

4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:

- ☒ all parts.
- ☐ the parts relating to claims Nos. _____

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 00/02904

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-16	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

This report makes reference to the following documents:

D1: EP-A-0 417 541

D2: B.J. GAFFNEY: "Chemical and biochemical crosslinking of membrane components", BIOCHIMICA BIOPHYSICA ACTA. vol. 822, 1985, pages 289-317

D3: WO-A-99/06446 (EYMANN ROLF; BECHTOLD UWE (DE); OTTERBACH JENS (DE); PASTERNAK RA) 11 February 1999 (1999-02-11)

1. The present application pertains to a process for the covalent cross-linking of bacteriorhodopsin in membrane-bound form. The applicant adds bacteriorhodopsin solutions to a bacterial transglutaminase solution and detects the resultant cross-linking by density gradient centrifugation.

The application claims a process for producing covalently cross-linked bacteriorhodopsin and in particular for producing linker-free covalently cross-linked bacteriorhodopsin and the use of said linker-free covalently cross-linked bacteriorhodopsin for photoelectric applications and three-dimensional data storage.

2. Novelty of Claims 1-16

The prior art does not describe processes for the covalent cross-linking of bacteriorhodopsin in membrane-bound form to itself or other substances, wherein cross-linking is catalysed by transglutaminase.

Therefore, Claims 1-13 meet the requirement for novelty (PCT Article 33(2)). The prior art likewise does not disclose linker-free cross-linked bacteriorhodopsin and consequently Claims 14-16 are also novel (PCT Article 33(2)).

3. Inventive step of Claims 1-11

D1, which is considered the closest prior art, discloses the oriented cross-linking of purple membrane preparations containing bacteriorhodopsin. Cross-linking is produced using a cross-linking agent selected from a group consisting of glutaraldehyde, carbodiimide and diamines. In contrast to D1, the application describes linker-free cross-linking, that is, bacteriorhodopsin molecules are cross-linked in the absence of bifunctional molecules as covalent bridges. The problem addressed by Claims 1-11 therefore consists in providing a process for the linker-free covalent cross-linking of bacteriorhodopsin molecules in membrane-bound form. Said technical problem is solved by the use of a transglutaminase that forms intra- or intermolecular bonds between the gamma-carboxamide group of a glutamine residue and the epsilon-amino group of a lysine residue. Transglutaminases are well known in the prior art as cross-linking agents. D2, which is a review article

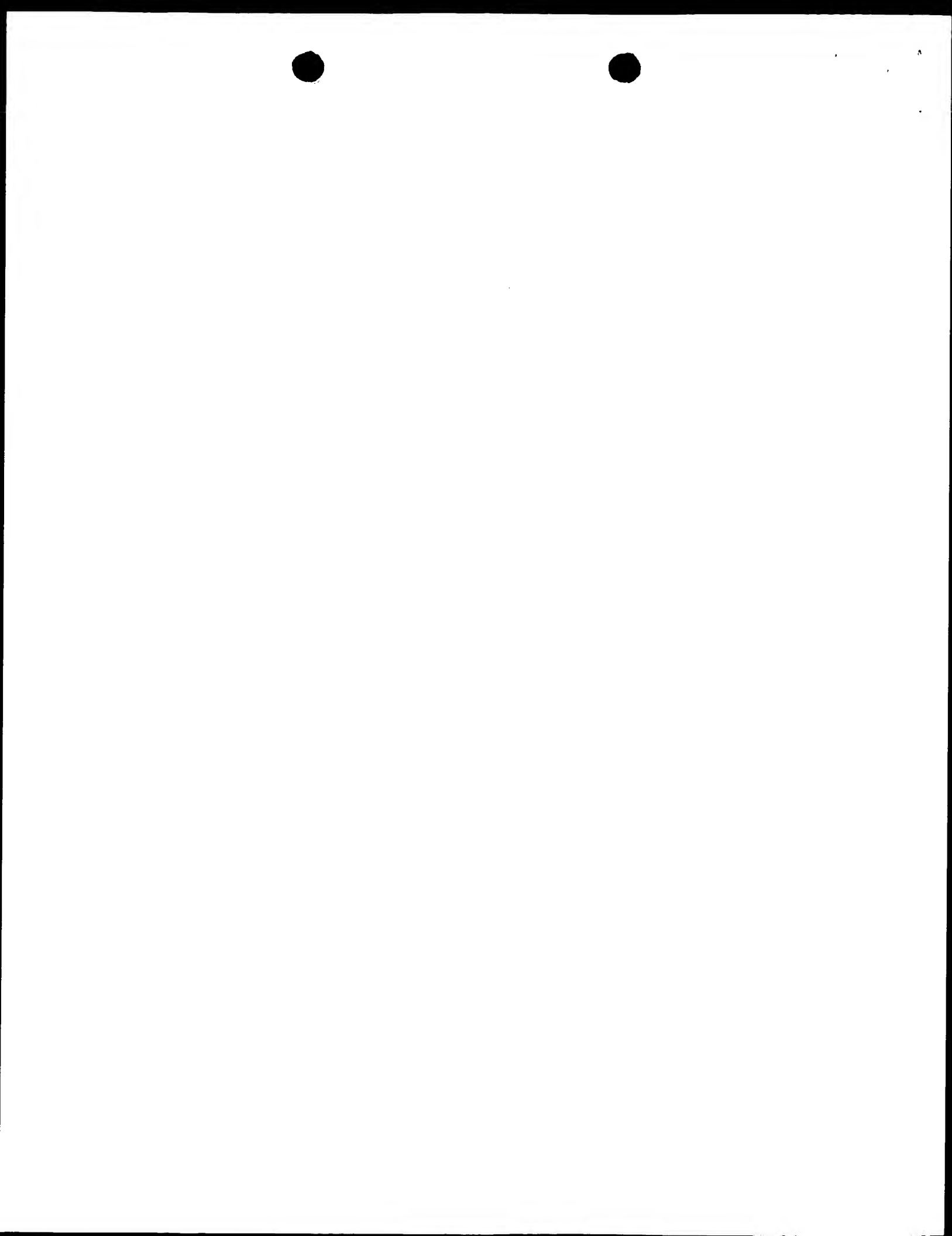
of various cross-linking techniques and applications, describes the use of transglutaminases to cross-link membrane proteins in erythrocytes (D2: page 304, Section V.A.; page 305, right-hand column, paragraph 3; page 290, right-hand column, paragraph 1). D2 further mentions that bacterial membrane proteins may be cross-linked, including bacteriorhodopsin in membrane-bound form (page 306, Section VIA-3 and page 311, Section VIB-5).

D3 (mentioned in the application) describes the transglutaminase-catalysed coupling of proteins to a carrier, explicitly including all proteins with Q/K residues as suitable (page 4, paragraph 3).

Linker-free cross-linking is intrinsic to the transglutaminase-catalysed cross-linking of proteins. To achieve the linker-free cross-linking of membrane-bound bacteriorhodopsin, a person skilled in the art would automatically apply this cross-linking technique. This would not require the person skilled in the art to review past work, but merely to be familiar with the problem of interest. Claims 1-11 are therefore obvious and do not meet the requirements of PCT Article 33(3).

4. Inventive step of Claims 11-16

The additional features of Claims 12-16 are either trivial, routine in this area of expertise or within the competence of a person skilled in the art wishing to improve the prior art listed in the search report. Therefore, the said claims do not involve an inventive step (PCT Article 33(3)).



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 00/02904

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: II.3

The examiner drops the objection to the claimed priority
and apologizes to the applicants for failing to note
DE 199 53 607.4

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV.4

The present application comprises more than one group of inventions:

Group 1: Claims 1-11 and 14-16: process for producing covalently cross-linked bacteriorhodopsin, characterized in that bacteriorhodopsin is reacted in membrane-bound form as the substrate of a transglutaminase to yield covalently cross-linked bacteriorhodopsin. Linker-free covalently cross-linked bacteriorhodopsin and uses.

Group 2: Claims 12 and 13: process for producing bacteriorhodopsin in membrane-bound form covalently cross-linked to a polymer/a surface/ and/or an auxiliary.

The formally dependent process Claims 12 and 13 are broader than independent Claim 1 since the said claims comprise the cross-linking of bacteriorhodopsin in membrane-bound form to any other substance, neither the term "surface" nor the term "auxiliary" being in any way limiting. Conversely, the claims belonging to Group 1 relate to the cross-linking of membrane-bound bacteriorhodopsin molecules to other membrane-bound bacteriorhodopsin molecules. This is obvious from the fact that membrane-bound bacteriorhodopsin is defined as the sole substrate of transglutaminase and is also indicated by the applicants (page 3, lines 6-9) as the technical problem of interest.

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV.4

PCT Rule 13.2 makes clear that, with respect to a claimed group of inventions, the requirement for unity of invention is fulfilled only when there is a technical relationship among these inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features. The expression "special technical features" means those technical features that define a contribution which each of the claimed inventions, considered as a whole, makes over the prior art. However, the technical feature in common between the two groups is transglutaminase, which is not inventive and so does not represent a special technical feature.

The objections raised in Box V do not currently include an objection concerning lack of unity of invention. However, the attention of the applicant is drawn to the possibility of such an objection on entering the regional phase.

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. Claims 3-8 relate to bacteriorhodopsin variants. Claims should define their subject matter clearly. However, a person skilled in the art would be unable to assign a definite structure to the term "bacteriorhodopsin variants". Therefore, the said claims do not meet the requirements of PCT Article 6.
2. The formally dependent Claims 12 and 13 are broader than independent Claim 1, since cross-linking is produced between bacteriorhodopsin and "polymers, a surface and/or auxiliaries". This is in no way limiting, since everything can have a surface (proteins, molecules, liquids, solid bodies) and the term "auxiliary" does not define structural features. The said claims are therefore unclear (PCT Article 6). Moreover, they should not have been drafted as dependent claims, since they do not satisfy PCT Rule 6.4(b) (see also Box IV, lack of unity of invention).

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)



T16

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 21520P WO	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/02904	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 31/03/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 31/03/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N11/02		
Anmelder HAMPP, Norbert		


- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 8 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☒ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☒ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 25/09/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 05.07.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Strobel, A Tel. Nr. +49 89 2399 7362





I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-17 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-16 ursprüngliche Fassung

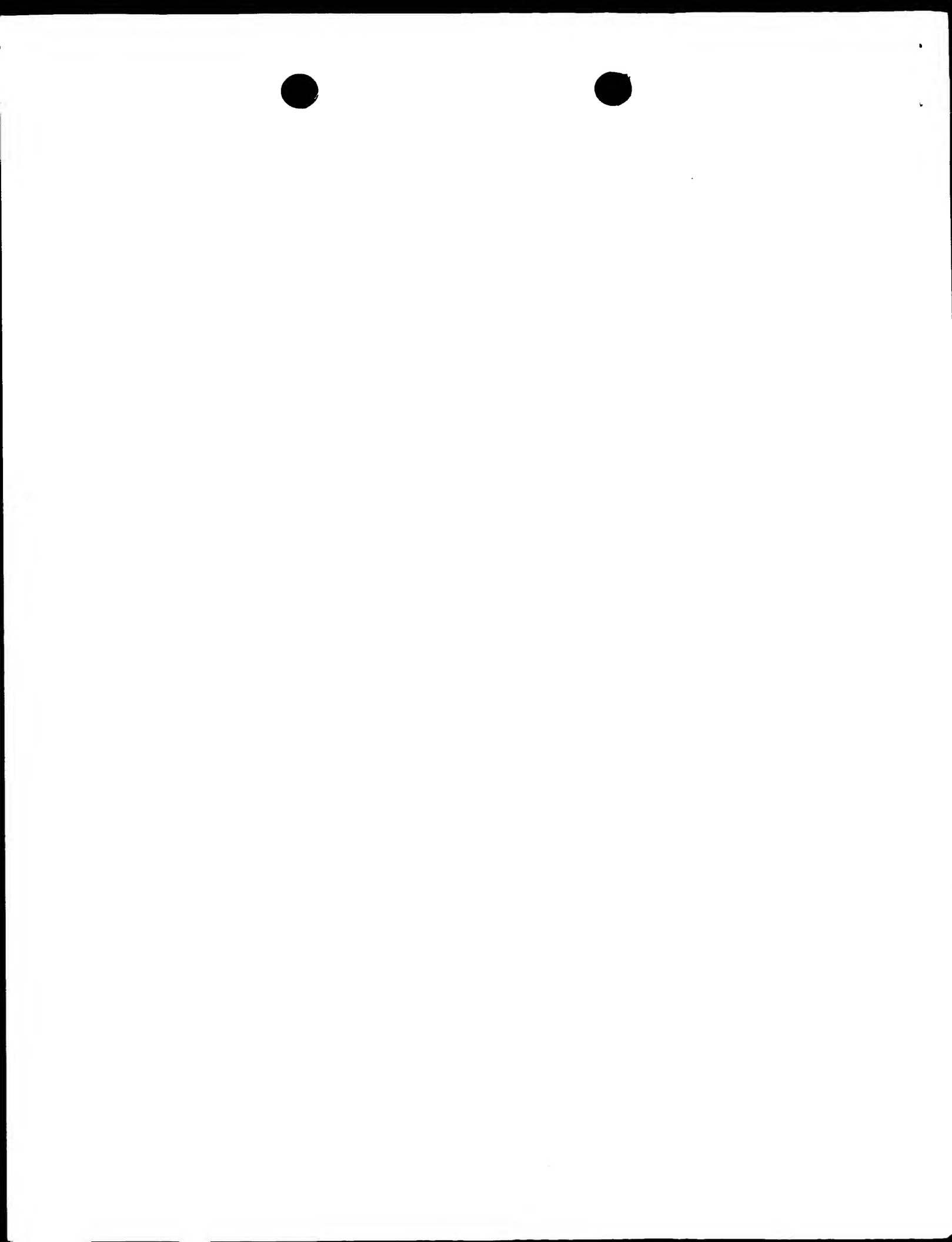
Zeichnungen, Blätter:

1/7-7/7 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
 - ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
 - ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).
3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:
- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
 - ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
 - ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
 - ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
 - ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
 - ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.
4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:



- ☐ Beschreibung, Seiten:
☐ Ansprüche, Nr.:
☐ Zeichnungen, Blatt:
5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

II. Priorität

1. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung der beanspruchten Priorität erstellt worden, da folgende angeforderte Unterlagen nicht innerhalb der vorgeschriebenen Frist eingereicht wurden:
- ☐ Abschrift der früheren Anmeldung, deren Priorität beansprucht worden ist.
 - ☐ Übersetzung der früheren Anmeldung, deren Priorität beansprucht worden ist.
2. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung der beanspruchten Priorität erstellt worden, da sich der Prioritätsanspruch als ungültig herausgestellt hat.

Für die Zwecke dieses Berichts gilt daher das obengenannte internationale Anmeldedatum als das maßgebliche Datum.

3. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:
siehe Beiblatt

IV. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung

1. Auf die Aufforderung zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren hat der Anmelder:
- ☐ die Ansprüche eingeschränkt.
 - ☐ zusätzliche Gebühren entrichtet.
 - ☐ zusätzliche Gebühren unter Widerspruch entrichtet.
 - ☐ weder die Ansprüche eingeschränkt noch zusätzliche Gebühren entrichtet.
2. ☐ Die Behörde hat festgestellt, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nicht erfüllt ist, und hat gemäß Regel 68.1 beschlossen, den Anmelder nicht zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren aufzufordern.



INTERNATIONALER VORLAUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/02904

3. Die Behörde ist der Auffassung, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nach den Regeln 13.1, 13.2 und 13.3

☐ erfüllt ist

☐ aus folgenden Gründen nicht erfüllt ist:

4. Daher wurde zur Erstellung dieses Berichts eine internationale vorläufige Prüfung für folgende Teile der internationalen Anmeldung durchgeführt:

☒ alle Teile.

☐ die Teile, die sich auf die Ansprüche Nr. beziehen.

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche 1-16
	Nein: Ansprüche
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche
	Nein: Ansprüche 1-16
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche 1-16
	Nein: Ansprüche

2. Unterlagen und Erklärungen siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt



Zu Punkt II

Priorität

Der Prüfer läßt den Einwand, die beanspruchte Priorität sei nicht gültig, fallen und entschuldigt sich bei den Anmeldern dafür, DE199 53 607.4 nicht beachtet zu haben.

Zu Punkt IV

Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung

Die vorliegende Anmeldung enthält mehrere Gruppen von Erfindungen:

Gruppe 1: Ansprüche 1-11, 14-16: Verfahren zur Herstellung von kovalent vernetztem Bakteriorhodopsin, dadurch gekennzeichnet, daß Bakteriorhodopsin in membrangebundener Form als Substrat einer Transglutaminase umgesetzt und dabei kovalent vernetzt wird. Linkerfrei kovalent vernetztes Bakteriorhodopsin und Anwendungen.

Gruppe 2: **Ansprüche 12 und 13:** Verfahren zur Herstellung von kovalent mit einem Polymeren/einer Oberfläche/ und/oder einem Hilfsstoff quervernetzten Bakteriorhodopsin in membrangebundener Form.

Die formal abhängigen Verfahrensansprüche 12 und 13 sind breiter als der unabhängige Verfahrensanspruch 1, da besagte Ansprüche die Quervernetzung von Bakteriorhodopsin in membrangebundener Form mit etwas beliebigem umfassen, denn weder der Begriff "Oberfläche" noch der Begriff "Hilfsstoff" sind irgendwie limitierend. Die Ansprüche der Gruppe 1 hingegen beziehen sich auf die Quervernetzung von membrangebundenen Bakteriorhodopsinmolekülen mit anderen membrangebundenen Bakteriorhodopsinmolekülen. Dies ist daraus ersichtlich, daß membrangebundenes Bakteriorhodopsin als einziges Substrat der Transglutaminase definiert wird. Dies wird von den Anmeldern auch auf Seite 3, Zeilen 6-9 der Beschreibung als zu lösende technische Aufgabe angegeben.

Regel 13.2 PCT stellt klar, daß bei einer beanspruchten Gruppe von Erfindungen nur dann das Erfordernis der Einheitlichkeit erfüllt ist, wenn zwischen diesen Erfindungen ein technischer Zusammenhang besteht, der in einem oder mehreren gleichen oder entsprechenden besonderen technischen Merkmalen zum Ausdruck kommt. Unter dem Begriff "besondere technische Merkmale" sind diejenigen technischen Merkmale zu



verstehen, die einen Beitrag jeder beanspruchten Erfindung als Ganzes zum Stand der Technik darstellen. Das beiden Gruppen von Erfindungen gemeinsame technische Merkmal "Transglutaminase" ist jedoch nicht erfinderisch und damit kein besonderes technisches Merkmal.

Angesichts der unter V. erhobenen Einwände erfolgt zum jetzigen Zeitpunkt kein Einheitlichkeitseinwand. Die Anmelder werden jedoch darauf hingewiesen, daß ein Einheitlichkeitseinwand beim Eintritt in die regionale Phase erhoben werden könnte.

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

Es wird auf folgende Dokumente verwiesen:

D1: EP 0 417 541 A

D2: B.J. GAFFNEY: "Chemical and biochemical crosslinking of membrane components" BIOCHIMICA BIOPHYSICA ACTA, Bd. 822, 1985, Seiten 289-317,

D3: WO 99 06446 A (EYMAN ROLF ;BECHTOLD UWE (DE); OTTERBACH JENS (DE); PASTERNAK RA) 11. Februar 1999 (1999-02-11)

1. Die vorliegende Anmeldung betrifft ein Verfahren zur kovalenten Quervernetzung von Bakteriorhodopsin in membrangebundener Form. Die Anmelder versetzen Bakteriorhodopsinlösungen mit einer bakteriellen Transglutaminaselösung und weisen die erfolgte Quervernetzung durch Zuckerdichte-Gradientenzentrifugation nach.

Die Anmeldung beansprucht Verfahren zur Herstellung von kovalent quervernetztem Bakteriorhodopsin, weiterhin linkerfrei kovalent quervernetztes Bakteriorhodopsin, die Verwendung besagten linkerfrei kovalent quervernetzten Bakteriorhodopsins für photoelektrische Anwendungen sowie zur dreidimensionalen Datenspeicherung.

2. Neuheit der Ansprüche 1-16

Der Stand der Technik beschreibt keine Verfahren zur kovalenten Quervernetzung von Bakteriorhodopsin in membrangebundener Form mit sich selbst oder anderen Gegenständen, bei denen die Quervernetzung durch



Transglutaminase katalysiert wird.

Deshalb erfüllen Ansprüche 1-13 die Anforderung der Neuheit (Artikel 33(2) PCT). Der Stand der Technik offenbart ebenfalls kein linkerfrei quervernetztes Bakteriorhodopsin, so daß auch Ansprüche 14-16 neu sind (Artikel 33(2) PCT).

3. Erfinderische Tätigkeit der Ansprüche 1-11

D1 als nächstliegender Stand der Technik offenbart die orientierte Quervernetzung von Purpurmembranpräparationen, die Bakteriorhodopsin enthalten. Die Quervernetzung erfolgt hierbei mit Glutaraldehyd, Carbodiimid oder Diaminen. Im Unterschied zu D1 erfolgt die Quervernetzung in der Anmeldung linkerfrei, d.h. ohne daß bifunktionelle Moleküle als kovalente Brücken die Verbindung zwischen Bakteriorhodopsinmolekülen herstellen. Die den Ansprüchen 1-11 zugrundeliegende technische Aufgabe ist somit die Bereitstellung eines Verfahrens zur linkerfreien kovalenten Quervernetzung von Bakteriorhodopsinmolekülen in membrangebundener Form. Die Lösung besagter technischer Aufgabe ist in der Verwendung einer Transglutaminase zu sehen, die intra- oder intermolekulare Bindungen zwischen der gamma-Carboxamidgruppe eines Glutaminrestes und der epsilon-Aminogruppe eines Lysinrestes knüpft. Transglutaminasen als Quervernetzungsagentien sind im Stand der Technik gut bekannt. D2 stellt einen Übersichtsartikel über die verschiedenen Quervernetzungstechniken und Anwendungen dar und beschreibt die Verwendung von Transglutaminasen zur Quervernetzung von Membranproteinen in Erythrozyten (D2, Seite 304, Abschnitt V.A, Seite 305, rechte Spalte, dritter Absatz, Seite 290, rechte Spalte, erster Absatz). D2 erwähnt weiterhin, daß bakterielle Membranproteine quervernetzt werden können, unter anderem Bakteriorhodopsin in membrangebundener Form (Seite 306, Abschnitt VIA-3 und Seite 311, Abschnitt VIB-5).

D3 (von Anmeldern) beschreibt die Transglutaminase-katalysierte Kopplung von Proteinen an einen Träger, wobei D3 ausdrücklich alle Proteine mit Q/K Resten als geeignet einschließt (Seite 4, dritter Absatz).

Die linkerfreie Quervernetzung ist eine inhärente Eigenschaft der Transglutaminase-katalysierten Quervernetzung von Proteinen. Der Fachmann würde ohne weiteres diese Quervernetzungstechnik auch auf membrangebundenes Bakteriorhodopsin anwenden, um linkerfreie Quervernetzung zu erreichen. Dabei handelt der Fachmann nicht in



rückschauender Betrachtungsweise, sondern kennt lediglich die zu lösende technische Aufgabe. Ansprüche 1-11 sind deshalb offensichtlich und erfüllen die Anforderungen von Artikel 33(3) PCT nicht.

4. Erfinderische Tätigkeit der Ansprüche 12-16

Die zusätzlichen Merkmale der Ansprüche 12-16 sind entweder trivial, gewöhnlich für das Fachgebiet oder liegen innerhalb der Kompetenz eines Fachmanns, der den im Recherchenbericht und unter angeführten Stand der Technik zu verbessern sucht. Deshalb enthalten besagte Ansprüche keine erfinderische Tätigkeit (Artikel 33(3) PCT).

Zu Punkt VIII

Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

1. Ansprüche 3-8 beziehen sich auf Bakteriorhodopsin-Varianten. Ansprüche müssen ihren Gegenstand deutlich definieren. Der Fachmann vermag jedoch dem Begriff "Bakteriorhodopsin-Varianten" keine definierte Struktur zuzuordnen. Daher erfüllen besagte Ansprüche die Erfordernisse von Artikel 6 PCT nicht.
2. Die formal abhängigen Ansprüche 12 und 13 sind breiter als der unabhängige Anspruch 1, weil als Quervernetzungspartner des Bakteriorhodopsins "Polymere, eine Oberfläche oder/und Hilfsstoffe" definiert werden. Dies ist in keiner Weise limitierend, denn alles kann eine Oberfläche haben (Proteine, Moleküle, Flüssigkeiten, Festkörper) und "Hilfsstoff" definiert keine strukturellen Merkmale. Besagte Ansprüche sind deshalb unklar (Artikel 6 PCT). Sie sollten außerdem nicht als abhängige Ansprüche formuliert werden, weil sie nicht Regel 6.4(b) PCT genügen (siehe auch Punkt IV. Mangelnde Einheitlichkeit).



•
•
•
•